

## 鸡 *Mx* 蛋白基因诱变修饰及抗病活性

倪黎纲<sup>1</sup>, 吴晓伟<sup>1</sup>, 程旭梅<sup>1</sup>, 陈昊<sup>2</sup>, 陈强<sup>1</sup>, 宋成义<sup>1</sup>, 徐琪<sup>1</sup>, 李碧春<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup> 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

(<sup>2</sup> 苏州大学医学院基础医学系, 苏州 215006)

(<sup>3</sup> 江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014)

**摘要:**【目的】进一步研究鸡 *Mx* 蛋白第 631 位氨基酸的变异与鸡群抗病性的相关性。【方法】本实验利用 PCR 突变技术将鸡 *Mx* 蛋白基因的全长 cDNA 第 2032 位的碱基由 G 突变为 A (即 631 位氨基酸的改变), 并将突变的 *Mx* 基因插入真核表达载体 pcDNA3.0, 重组表达载体转染 COS-1 细胞后, 进行 RT-PCR 与间接免疫荧光 (IFA) 鉴定。【结果】对鸡 *Mx* 蛋白基因的 cDNA 进行 PCR 诱变修饰正确, 构建了能够正确表达鸡 *Mx* 蛋白的重组真核表达载体; 诱变修饰重组 *Mx* 蛋白对抗新城疫病毒 (NDV) 感染分析结果显示, 重组 *Mx* 蛋白具有较强的抗新城疫病毒生物活性。【结论】为下一步研究鸡 *Mx* 蛋白的抗病机理与制备抗病转基因鸡奠定了坚实的基础。

**关键词:** *Mx* 蛋白; PCR 突变; 抗病毒活性; 新城疫病毒

**中图分类号:** S85      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2008) 06-0785-05

*Mx* 蛋白在许多生物体内发现, 是 I 型干扰素诱导的蛋白, 属于大分子 GTP 酶动态蛋白家族, 具有广泛的抗 RNA 病毒作用, 如小鼠 *Mx1* 蛋白证明能抑制流感病毒、多里病毒、索戈托病毒的复制; 小鼠 *Mx2* 蛋白能抑制棒状疱疹性口炎病毒的复制<sup>[1, 2]</sup>; 人 *MxA* 蛋白能抑制麻疹副粘病毒、棒状疱疹性口炎病毒、布尼亚病毒、白蛉病毒、汉坦病毒、3 型腺病毒的复制<sup>[3, 4]</sup>。

目前关于禽类 *Mx* 蛋白的研究相对较少, 1992 年, Bazzhiger 等<sup>[5]</sup>首次发现了鸭的 *Mx* 蛋白, 随后鸡的 *Mx* 蛋白基因也被克隆<sup>[6]</sup>, 但未检测到鸭和鸡 *Mx* 蛋白的抗病病毒活性。Ko 等<sup>[7]</sup> 2002 年通过对不同品系鸡 *Mx* 蛋白的研究发现部分品系鸡 *Mx* 蛋白具有抗病毒活性, 并检测到鸡的 *Mx* 蛋白的抗病毒活性受 631 位氨基酸的影响, 当 631 位氨基酸为天冬酰胺时有抗病毒活性, 为丝氨酸时则无抗病毒活性。但将鸡 *Mx* 蛋白用于提高鸡体免疫力转基因的研究还未见报道。本实验正是基

于上述思路, 拟采用 PCR 突变技术改造鸡 *Mx* 蛋白第 631 位氨基酸, 旨在获得具有抗病毒活性的鸡 *Mx* 蛋白基因, 以便进一步研究鸡 *Mx* 蛋白抗病毒作用机理, 并为家禽的抗病育种提供新思路。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、质粒、细胞株与病毒:** DH<sup>5α</sup>大肠杆菌、pcDNA3.0 质粒载体为本室保存; 含有鸡 *Mx* 全基因序列质粒 pMD19-T-*Mx* 由作者自行构建<sup>[8]</sup>; COS-1 细胞株为扬州大学兽医学院孙怀昌教授惠赠; NDV 强毒株 F<sub>48</sub>E<sub>8</sub> 为扬州大学兽医学院朱国强教授惠赠。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 高保真 *Pfu* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、*Not*、*Xba* 限制性内切酶、T4 连接酶等购于深圳中晶生物技术有限公司; 胶回收试剂盒购于大连宝生物工程公司; 梭华-Sofast® 为厦门太阳马生物工程有限公司产品; 羊抗鼠 IgG-FIT 抗体为上海吉

基金项目: 国家自然科学基金(30671509); 高等学校博士学科点专项科研基金(20061117004)

\*通讯作者。Tel: +86-514-87997207; Fax: +86-514-87350440; E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

作者简介: 倪黎纲(1982-), 男, 江苏吴江人, 在读硕士, 研究方向: 动物胚胎工程与生物技术。E-mail: nlgangworld@gmail.com

收稿日期: 2007-11-29; 修回日期: 2008-03-23

泰生物科技有限公司产品;所用鸡 *Mx* 蛋白多克隆抗体由作者研制而成(效价为 1:800);其余试剂均为上海生工生物工程技术有限公司的分析纯级试剂。

**1.1.3 引物设计:**全长 *Mx* cDNA 引物  $P_1$ 、 $P_2$  的设计参照文献<sup>[7]</sup>,并在上下引物分别引入酶切位点 *Not*、*Xba*;突变引物  $P_3$  根据全长 *Mx* cDNA 的克隆测序的结果设计。引物序列如下:上游引物  $P_1$ : 5'-ATGCGGCCGCATAG-AGCAAGCCAGAAGAACAGC-AG-3' bp 113-137,下游引物  $P_2$ : 5'-GCTCTAGAGCTTTGACAAGGGTATGGCATATCAG-3' bp 2432-2408,突变引物  $P_3$ : 5'-CACTGGAGCAAATAAACGCCTGAGCAATC-3' bp 2021-2049。引物  $P_1$ 、 $P_2$  的下划线标出引入的酶切位点,引物  $P_3$  的下划线标出基因突变的位置。

## 1.2 PCR 诱变修饰全长 *Mx* cDNA

PCR 诱变参照文献<sup>[9]</sup>,第一轮 PCR 扩增,以  $P_2$ 、 $P_3$  为引物,重组质粒 pMD19-T-*Mx* 为模板,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析后,切胶回收,命名为大引物  $P_4$ 。第二轮 PCR 扩增的第一阶段以  $P_1$  和  $P_4$  为引物,重组质粒 pMD19-T-*Mx* 为模板,扩增全长突变终产物;第二阶段以  $P_1$ 、 $P_2$  为引物,第一阶段 PCR 扩增产物为模板,指数扩增全长突变终产物。

突变产物切胶回收后与 pMD19-T Simple 载体连接,经 PCR 和 *Not*、*Xba* 限制性内切酶双酶切鉴定后,将含正确插入片段的重组质粒命名为 pMD19-T-MM<sub>x</sub>,同时送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

## 1.3 真核表达载体的构建

将经测序证实突变阳性重组质粒 pMD19-T-MM<sub>x</sub> 用 *Not*、*Xba* 进行双酶切,切胶回收 2.3 kb 左右的目的片段,同时将 pcDNA3.0 质粒载体用 *Not*、*Xba* 双酶切并切胶回收。然后将目的片段与质粒连接,转化,涂布在含终浓度为 2.5% 的 Amp 抗生素低盐 LB 平板上,37℃ 培养箱静置培养。随机挑取单菌落,少量提取质粒 DNA 进行 PCR,酶切和测序鉴定,阳性重组质粒命名为 pcDNA3.0-MM<sub>x</sub>。

## 1.4 脂质体法转染 COS- 细胞

细胞转染分为 2 组:实验组,用梭华-Sofast®试剂进行 pcDNA3.0-MM<sub>x</sub> 转染;对照组,转染空质粒 pcDNA3.0。

于 6 孔板中加入对数生长期的 COS- 细胞  $2 \times 10^5$  个,2 mL 培养基(DMEM)含 10% 的小牛血清,

培养至 90% 细胞汇合。转染方法按梭华-Sofast®试剂说明书,48 h 后收集细胞进行检测。

## 1.5 RT-PCR 检测转染 *Mx* 蛋白基因的表达

提取转染后 COS- 细胞总 RNA,并进行逆转录,以  $P_1$ 、 $P_2$  为引物进行 PCR 产物检测。

## 1.6 间接免疫荧光检测转染 *Mx* 蛋白基因的表达

转染 48 h 后,与对照组进行 10% 的甲醛固定,然后利用自制鸡 *Mx* 蛋白多克隆抗体进行间接免疫荧光检测其表达,具体方法步骤见参考文献<sup>[10]</sup>。

## 1.7 新城疫病毒接种细胞及其 TCID<sub>50</sub> 测定

6 孔培养板培养的鸡成纤维(CEF)细胞长至单层时,弃去生长液,用 PBS 洗 3 次,以 1:100 倍稀释的新城疫病毒尿囊液接种 CEF 细胞,温育 30 min,然后补加 1% FCS 的培养基(DMEM),37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞完全产生病变后收获病毒,进行 TCID<sub>50</sub> 测定,具体方法步骤见参考文献<sup>[11]</sup>。

## 1.8 抗新城疫病毒活性的检测

pcDNA3.0-MM<sub>x</sub> 质粒转染 COS- 细胞 48 h 后,去培养上清,超声波裂解细胞,提取细胞裂解液,作适当纯化处理后,将其作 2~256 倍梯度稀释、加至长满单层的 CEF 细胞的 96 孔板,37℃ 孵育 24 h,弃上清,感染 100 TCID<sub>50</sub> 的新城疫病毒,同时设立转染空质粒细胞裂解液与不孵育处理 CEF 细胞为阴性对照,未感染新城疫病毒的 CEF 细胞为阳性对照。培养 2~3 d,观察 CEF 细胞病变,以抑制 50% 细胞病变为标准。

# 2 结果

## 2.1 PCR 诱变修饰

突变产物经克隆测序,结果在引入突变处产生了预期突变,该基因编码的第 631 个丝氨酸(AGT)被天冬酰胺(AAT)替换,其它处与原序列吻合良好(图 1),表明诱变成功。

## 2.2 真核表达载体的构建

将阳性诱变重组质粒和表达质粒 pcDNA3.0 经 *Not* 和 *Xba* 双酶切后,连接,转化,抽提质粒 DNA。以 *Not* 和 *Xba* 双酶切,得到与目的基因约 2.3 kb 及载体约 5.4 kb 相同大小的 2 个片段;*Xba* 单酶切后,得到大小约 7.8 kb 的片段,与预期结果相符,以该质粒为模板,用引物  $P_1$  和  $P_2$  扩增出大小约为 2.3 kb 的特异性条带(图 2)。

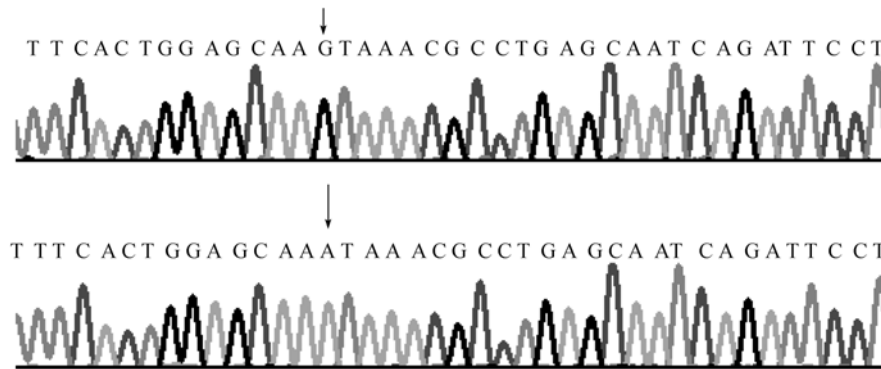


图 1 部分测序结果

Fig. 1 The part result of sequence. Arrow denotes the site-directed mutagenesis.

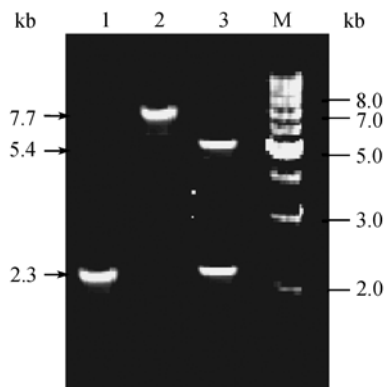


图 2 重组质粒 pcDNA3.0-MMx 的酶切和 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.0-MMx With restriction enzyme digestion and PCR amplification. M. 1 Kb Marker; 2. PCR production; 3. *Xba* production; 4. *Not* and *Xba* production.

### 2.3 RT-PCR 检测转染 *Mx* 蛋白基因的表达

提取转染后 COS- 细胞总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析结果: 实验组出现大小为约 2.3 kb 的特异性条带, 而实验对照组未出现条带(图 3), 表明目的基因转染 COS- 细胞后发生基因转录。

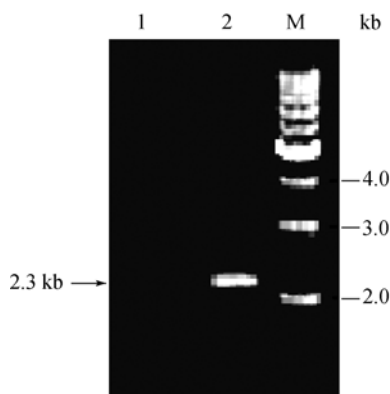


图 3 转染细胞的 RT-PCR 分析

Fig. 3 Analysis of transfected cells by RT-PCR. M. 1kb Marker; 1. RT-PCR production of pcDNA3.0; 2. RT-PCR production of pcDNA3.0-MMx.

### 2.4 间接免疫荧光检测转染 *Mx* 蛋白基因的表达

间接免疫荧光检测发现, pcDNA3.0-MMx 转染的 COS- I 细胞上可见明显荧光, 细胞轮廓清晰, 而实验对照组的细胞上没看到明显荧光(图 4), 进一步证明目的基因转染 COS- I 细胞后发生基因转录和翻译, 表达重组质粒 pcDNA3.0-MMx 成功表达 *Mx* 蛋白。

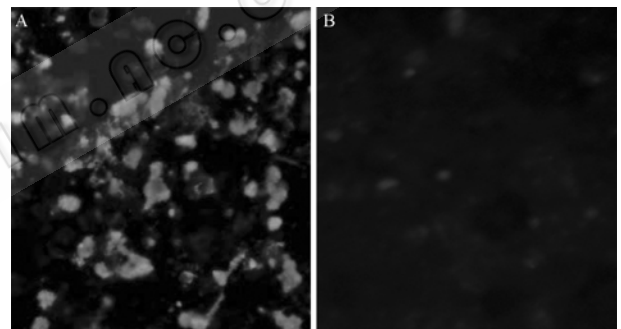
图 4 IFA 分析 *Mx* 基因在转染的 COS- 细胞中的表达

Fig. 4 Analysis of transient expression of *Mx* gene in transfected COS- cell by IFA. A: COS- cell transfected with pcDNA3.0-MMx; B: COS- cell transfected with pcDNA3.0.

### 2.5 新城疫病毒 TCID<sub>50</sub> 测定

新城疫病毒接种细胞, 48 h 发生明显的病变, 收集病毒, 采用鸡胚成纤维细胞, 在 96 孔细胞板上测定病毒的滴度为  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。

### 2.6 抗新城疫病毒试验

攻毒 48 h 后结果见表 1 和图 5, 可见 2~8 倍稀释的重组鸡 *Mx* 蛋白尚可保护 CEF 细胞免受 100TCID<sub>50</sub> 感染, CEF 细胞仍紧贴细胞瓶壁生长, 纤维状形态; 未受保护的 CEF 细胞产生细胞病变, 细胞出现变圆、脱落死亡和形成合胞体, 这表明重组 pcDNA3.0-MMx 质粒转染 COS- I 细胞产生的鸡 *Mx* 蛋白孵育 CEF 细胞后有明显的抗新城疫病毒活性。

表 1 鸡 *Mx* 蛋白抗 NDV 病毒结果  
Table 1 Anti-NDV activity of recombinant chicken *Mx* protein

Group	Challenged by NDV	CPE <sub>50</sub>							
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
chicken <i>Mx</i> protein	100TCID <sub>50</sub> (48 h)	-	-	-	+	+	+	+	+
Negative Control	100TCID <sub>50</sub> (48 h)	+	+	+	+	+	+	+	+

+: CPE50 positive; -: CPE50 negative.

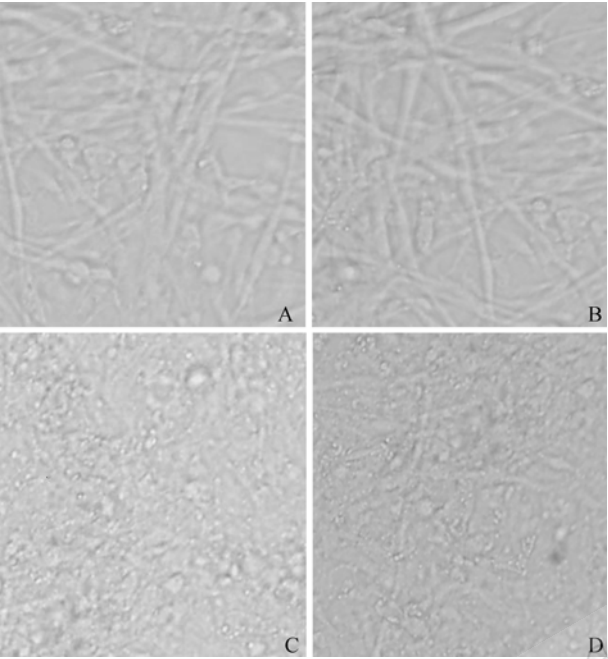


图 5 攻毒 48 h 后鸡胚成纤维细胞图  
Fig. 5 CEF attacked by 100 TCID<sub>50</sub> NDV after 48 h. A: Anti-NDV CEF; B : Normal of CEF; C and D: CPE.

3 讨论

现有的研究发现鸡 *Mx* 蛋白的抗病毒活性与编码该蛋白的第 631 位氨基酸相关, Ko 等<sup>[7]</sup>2002 年测定和分析 25 个鸡种的 *Mx* 基因,发现鸡 *Mx* 基因呈多态型,在 25 个位点发生了碱基替换,其中 15 个位置碱基替换引起氨基酸的改变,接着体外试验发现当鸡 *Mx* 蛋白第 631 位的氨基酸为天冬酰胺 (Asn) 时,该 *Mx* 蛋白具有抗流感病毒和棒状疱疹性口炎病毒的活性,而第 631 位氨基酸由 Asn 替换为丝氨酸 (Ser) 时则无抗病毒活性,其他 14 个位置氨基酸的多态性表现与抗病活性不相关。随后, Ko 等<sup>[12]</sup>2004 年使用人工突变技术,使 *Mx* 蛋白 631 位氨基酸 Ser (AGT) 与 Asn (AAT) 之间发生相互突变试验,进一步确定 631 位氨基酸对 *Mx* 蛋白的抗病活性功能是否起关键作用。本试验采用简便、高效的大引物 (megaprimer)PCR 定点突变技术来修饰该序列,通过设计 3 条引物和进行两轮 PCR 循环,成功地使该序列的

第 2032 位的碱基由 G 突变为 A。

将突变的鸡 *Mx* 基因亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.0 的多克隆位点,经 PCR、酶切证实鸡 *Mx* 基因以正确的开放读码框架连接到真核表达载体 pcDNA3.0。并用转染效率较高的脂质体法转染 COS- 细胞, RT-PCR 和间接免疫荧光 (IFA) 检测表明,重组质粒在 COS- 细胞中成功表达,表达的蛋白具有正确的免疫学活性。

*Mx* 蛋白是 型干扰素诱导的蛋白,具有广泛的抗 RNA 病毒作用,在人、小鼠、大鼠、猪、牛等哺乳类动物,还包括鱼类都发现了类似的 *Mx* 蛋白,并且都具有抗病毒活性,能抑制流感病毒、多里病毒、索戈托病毒、麻疹副粘病毒、疱疹性口炎病毒等 RNA 病毒的复制。在禽类方面, Ko 等<sup>[8,12]</sup>2002 年,2004 年发现抗性鸡 *Mx* 蛋白能够抑制流感病毒和疱疹性口炎病毒两种病毒的感染;在国内,陈蕾等<sup>[13]</sup>2007 年利用原核表达系统发现鸡 *Mx* 蛋白能抑制鸡新城疫病毒的感染。本试验在国内首次通过真核表达系统研究鸡 *Mx* 蛋白的抗病活性,通过转染 COS- 细胞,提取细胞表达蛋白后,微量细胞病变抑制法 (CEF-DNV 系统) 测定重组鸡 *Mx* 蛋白抗病活性,结果重组鸡 *Mx* 蛋白尚可保护 CEF 细胞免受新城疫病毒感染。

本研究正确克隆了鸡 *Mx* 基因,并成功对该基因进行 PCR 诱变修饰及其构建了能够表达鸡 *Mx* 基因的重组真核表达载体,进一步研究鸡 *Mx* 蛋白抗病活性。实验结果表明我们已经获得具有抗病活性的重组鸡 *Mx* 蛋白基因,下一步我们将在抗病毒作用机理与制备抗病转基因鸡做一些研究工作。

参 考 文 献

[1] Lindenmann J, Lane CA, Hobson D. The resistance of A2G mice to orthomyxoviruses. *J Immunol*, 1963, 90: 942-951.  
[2] Jin HK, Takada A, Kon Y, *et al.* Identification of the murine *Mx2* gene: interferon-induced expression of the *Mx2* protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus.

- J Virol*, 1999, 73(6): 4925–4930.
- [3] Aebi M, Fäh J, Hurt N, *et al.* cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *J Mol Cell Biol*, 1989, 9: 5062–5072.
- [4] Weber F, Haller O, Kochs G. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J Virol*, 2000, 74(1): 560–563.
- [5] Bazzhiger L, Schwarz A, Staeheli P. No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein. *J Virology*, 1992, 195(1): 100–112.
- [6] Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *Interferon Cytokine Res*, 1995, 15(1): 47–53.
- [7] Ko JH, Jin HK, Asano A, *et al.* Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *J Genome Res*, 2002, 12(4): 595–601.
- [8] 倪黎纲, 程金花, 谢飞. 鸡 Mx 基因全长 cDNA 序列的克隆及分析. 扬州大学学报(*Journal of Yangzhou University*), 2007, 28(3): 34–36.
- [9] Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, *et al.* A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(21): 6545–6551.
- [10] 刘华雷, 魏建超, 周斌, 等. 禽流感病毒血凝素基因突变体的构建及其在 293T 细胞中的表达. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(4): 614–616.
- [11] 齐立, 吴昆昱, 李梓, 等. 在 MDCK 细胞上高产的乙型流行性感冒病毒株的筛选及其全基因组克隆. 病毒学报(*Chinese Journal of Virology*), 2004, 20(3): 195–199.
- [12] Ko JH, Takada A. Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631. *J Anim Genet*, 2004, 35(2): 119–122.
- [13] 陈蕾, 江国托, 常维山. 鸡 Mx 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 农业生物技术学报(*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2007, 15(2): 203–206.

## Mutagenesis modified of Mx Gene from chicken and Identification of its antiviral specificity

Ligang Ni<sup>1</sup>, Xiaowei Wu<sup>1</sup>, Xumei Cheng<sup>1</sup>, Hao Chen<sup>2</sup>, Qiang Chen<sup>1</sup>,  
Chengyi Song<sup>1</sup>, Qi Xu<sup>1</sup>, Bichun Li<sup>1, 3\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(<sup>2</sup>Medical School of Suzhou University, Suzhou University, Suzhou 215000, China)

(<sup>3</sup>Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** [Objective] To study whether the antiviral specificity of chicken Mx protein is determined by an amino acid substitution at position 631. [Methods] We used PCR site-directed mutagenesis technique by which a single amino acid was reciprocally substituted G with A at position 2032bp of chicken Mx cDNA. Sequence analysis confirmed successful mutation from G to A at 2032bp of chicken Mx cDNA. The fragments amplified by PCR containing the mutation site were subcloned into a eukaryotic expression vector. Then the recombinant vector was transfected into COS- cell, Mx gene and Mx protein in the transfected COS- cell were detected by RT-PCR and indirect fluorescence assay. [Results] The results showed that COS- cell transfected the recombinant plasmid could stably express the Mx protein. The antivirus assay showed that Mx protein had characteristics of resistance to infection of Newcastle Disease Virus. [Conclusion] This study may provide a basis of the virus-resistant mechanism of Mx protein and production of virus-resistant transgenic chicken.

**Keywords:** Mx protein; PCR Mutagenesis; Virus-resistant activity; Newcastle Disease Virus

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671509) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20061117004)

\*Corresponding author. Tel: +86-514-87997207; Fax: +86-514-87350440; E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

Received: 29 November 2007/ Revised: 23 March 2008